



## ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΕΑΒΑΑ-5, έκδοση 1η

### ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Προσδιορισμός γαλακτικού στο αίμα με εργαστηριακή μέθοδο

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Ο προσδιορισμός του γαλακτικού στο αίμα είναι χρήσιμος για την εκτίμηση της αερόβιας και της αναερόβιας ικανότητας αθλητών/-ριών και ασκούμενων, για την αξιολόγηση των προσαρμογών στην προπόνηση, καθώς και για τον προγραμματισμό της. Πρόκειται για μια διαδικασία που απαιτεί πολύ μικρή ποσότητα τριχοειδικού αίματος. Ο προσδιορισμός είναι ενζυμικός φασματοφωτομετρικός, στηρίζεται δηλαδή στη μέτρηση προϊόντος ενζυμικής αντίδρασης σε φασματοφωτόμετρο. Η μέθοδος στηρίζεται σε παλιό κιτ της εταιρείας Sigma (826-UV), το οποίο έχει πλέον διακοπεί. Προϋπόθεση για την εκτέλεση της διαδικασίας είναι η γνώση βασικών τεχνικών βιοχημικού εργαστηρίου.

### ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΑ ΠΡΟΣΩΠΑ

Χειριστής/-ρια, αναλυτής/-ρια (μπορεί να είναι το ίδιο πρόσωπο), εξεταζόμενος/-η

### ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
1	Πιπέτα	Των 10-100 μL
2	Πιπέτα	Των 20-200 μL
3	Πιπέτα	Των 100-1000 μL
4	Πιπέτα	Των 500-5000 μL
5	Φασματοφωτόμετρο	Unico 4802 UV/VIS Double Beam
6	Φυγοκεντρητής	Hettich Micro 22R
7	Αναλυτικός ζυγός	Kern ABT 120 - 5DM
8	Επωαστικός κλίβανος	Memmert
9	Κυκλομεικτής	Vortex-Genie 2
10	Γυάλινες κυψελίδες	Semi-micro
11	Σπάτουλα	Για μεταφορά μικροποσοτήτων στερεών ουσιών
12	Στατώ για φιαλίδια erpendorf	
13	Χρονόμετρο	
14	Στυλό τρυπήματος δέρματος	
15	Γενικά εργαστηριακά σκεύη	Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας
16	Τσάντα-φορητό ψυγείο με παγοκύστες	Για τη μεταφορά εξοπλισμού και δειγμάτων
17	Φόρμες καταγραφής αποτελεσμάτων	Ντοσιέ, τετράδιο κλπ.
18	Καταψύκτης	-20°C

### ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
1	Ρύγχη	Κίτρινα, των 10-200 μL
2	Ρύγχη	Μπλε, των 100-1000 μL
3	Ρύγχη	Άχρωμα, των 500-5000 μL
4	Σκαριφιστήρες	Μιας χρήσης, απλοί ή συμβατοί με το στυλό τρυπήματος δέρματος
5	Χαρτομάντηλα	
6	Οινόπνευμα	
7	Γάντια	Εξεταστικά, μιας χρήσης (μέγεθος ανάλογα με τον/την χειριστή/-ρια)

8	Φιαλίδια eppendorf	Του 1,5 mL
9	Υπερχλωρικό οξύ (HClO <sub>4</sub> )	
10	Απεσταγμένο νερό	
11	Glycine buffer solution 0.6 M	Sigma-Aldrich G5418. Αποθήκευση στο ψυγείο (4°C).
12	L-Lactic dehydrogenase from rabbit muscle type II, ammonium sulfate suspension, 800-1,200 units/mg protein	Sigma-Aldrich L2500. Αποθήκευση στο ψυγείο (4°C).
13	NAD	Applichem A1124,0001. Αποθήκευση στην κατάψυξη (-20°C).
14	«Γόνδολες» ζύγισης	
15	Στυλό και ανεξίτηλα μαρκαδοράκια	S ή M
16	Δοχείο απόρριψης βιολογικών υλικών	

### ΒΗΜΑΤΑ

A/α	Τίτλος	Εκτελών/-ούσα	Ενέργειες
1	Παρασκευή διαλύματος 0,3 mol/L HClO <sub>4</sub>	Χειριστής/-ρια	Σε καθαρή φιάλη των 100 mL αναμειγνύει 97,1 mL απεσταγμένου νερού και 2,9 mL HClO <sub>4</sub> .
2	Προετοιμασία φιαλιδίων eppendorf για λήψη δειγμάτων αίματος	Χειριστής/-ρια	Τοποθετεί 140 μL διαλύματος 0,3 mol/L HClO <sub>4</sub> σε όσα φιαλίδια eppendorf είναι τα δείγματα που θέλει να λάβει. Είναι καλό να αριθμεί τα φιαλίδια με ανεξίτηλο μαρκαδόρο πριν τη δοκιμασία άσκησης. Τοποθετεί τα φιαλίδια σε στατώ.
3	Προετοιμασία εξοπλισμού	Χειριστής/-ρια	Σε τσάντα (εφόσον χρειάζεται μεταφορά) βάζει όλο τον απαραίτητο εξοπλισμό για τη λήψη των δειγμάτων αίματος. Επίσης, ετοιμάζει φορητό ψυγείο με παγοκύστες για τη μεταφορά των δειγμάτων.
4	Προετοιμασία εξεταζόμενου/-ης	Χειριστής/-ρια	Φορώντας γάντια, σκουπίζει με χαρτομάντηλο, εμποτισμένο με οινόπνευμα, το δάχτυλο ή τον λοβό του αυτιού απ' όπου θα γίνει η λήψη αίματος. Φροντίζει το δάχτυλο να παραμείνει στεγνό και καθαρό για λίγο.
5	Τρύπημα δαχτύλου	Χειριστής/-ρια	Με σκαριφιστήρα μιας χρήσης κάνει ένα μικρό τρύπημα στη ράγα ενός δαχτύλου ή τον λοβό ενός αυτιού. Πετάει τον σκαριφιστήρα σε δοχείο απόρριψης βιολογικών υλικών.
6	Λήψη δείγματος αίματος	Χειριστής/-ρια	Με την πιπέτα των 10-100 μL, στην οποία έχει τοποθετήσει κατάλληλο ρύγχος, λαμβάνει 14 μL αίματος από τη σταγόνα που δημιουργήθηκε από το τρύπημα και τα μεταφέρει σε φιαλίδιο eppendorf με 0,3 mol/L HClO <sub>4</sub> κάνοντας πολλαπλές πλύσεις του ρύγχους. Κλείνει, ανακινεί και επιστρέφει το φιαλίδιο στο στατώ. Γράφει στη φόρμα σε ποιο άτομο και τι συνθήκη αντιστοιχεί ο αριθμός δείγματος.
7	Σκούπισμα δαχτύλου ή αυτιού εξεταζόμενου/-ης	Εξεταζόμενος/-η	Σκουπίζει και πιέζει το τρύπημα με το εμποτισμένο με οινόπνευμα χαρτομάντηλο.

8	Αποθήκευση των δειγμάτων	Χειριστής/-ρια	Τοποθετεί το στατώ με τα φιαλίδια erpendorf που περιέχουν δείγματα στο φορητό ψυγείο μέχρι να τα μεταφέρει στο εργαστήριο. Αν ο προσδιορισμός γαλακτικού δεν γίνει αμέσως, αποθηκεύει τα δείγματα στον καταψύκτη του εργαστηρίου μέχρι την ανάλυσή τους.
9	Προετοιμασία ανάλυσης	Αναλυτής/-ρια	Βγάζει δείγματα και αντιδραστήρια (glycine buffer, L-lactic dehydrogenase, NAD) από τον καταψύκτη ή το ψυγείο και τα αφήνει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
10	Υπολογισμός ποσότητας διαλύματος εργασίας	Αναλυτής/-ρια	Υπολογίζει την ποσότητα του διαλύματος εργασίας που θα χρειαστεί πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό K των απαιτούμενων δειγμάτων (δείγματα αίματος + τυφλό) επί 0,725 mL.
11α	Παρασκευή διαλύματος εργασίας  α. Ζύγιση NAD και προσθήκη απεσταγμένου νερού	Αναλυτής/-ρια	Ενεργοποιεί τον αναλυτικό ζυγό πατώντας ON. Φροντίζει ώστε ο δίσκος ζύγισης να είναι καθαρός. Αφού ο ζυγός κάνει αυτόματα βαθμονόμηση, τοποθετεί τη γόνδολα ζύγισης στον δίσκο και πατάει TARE. Στην συνέχεια, με μια μικρή σπάτουλα, μεταφέρει NAD από το φιαλίδιο στη γόνδολα. Ζυγίζει $K \times 1,19$ mg NAD. Επειδή είναι δύσκολο να ζυγίσει την ακριβή ποσότητα, ζυγίζει λίγο περισσότερο, καταγράφει πόσο ζύγισε (Z mg) και προσαρμόζει τις αναλογίες των επόμενων αντιδραστηρίων σύμφωνα με την ζυγισμένη ποσότητα. Μεταφέρει το ζυγισμένο NAD σε μια μικρή κωνική φιάλη ή άλλο μικρό σκεύος. Προσθέτει $Z \times 0,4$ mL απεσταγμένο νερό.
11β	Παρασκευή διαλύματος εργασίας  β. Προσθήκη glycine buffer	Αναλυτής/-ρια	Προσθέτει $Z \times 0,2$ mL glycine buffer, φροντίζοντας να μην αγγίξει με το ρύγχος της πιπέτας τη σταγόνα χλωροφορμίου που υπάρχει στον πυθμένα της φιάλης του αντιδραστηρίου ως συντηρητικό.
11γ	Παρασκευή διαλύματος εργασίας  γ. Προσθήκη L-lactic dehydrogenase	Αναλυτής/-ρια	Προσθέτει Z mL L-lactic dehydrogenase. Ανακινεί καλά το διάλυμα εργασίας και το κρατά σφραγισμένο στη φιάλη. Το διάλυμα είναι σταθερό για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και για 24 ώρες σε ψυγείο (4°C).
12α	Προετοιμασία οργάνων  α. Άνοιγμα φασματοφωτόμετρου	Αναλυτής/-ρια	Ενεργοποιεί το φασματοφωτόμετρο πατώντας το κουπί ON, που βρίσκεται πίσω κάτω δεξιά. Αφήνει το όργανο να προθερμανθεί και, στο άκουσμα του ήχου ειδοποίησης, πατάει Yes για βαθμονόμηση.
12β	Προετοιμασία οργάνων  β. Άνοιγμα κλιβάνου	Αναλυτής/-ρια	Ενεργοποιεί τον κλιβάνο γυρνώντας τον δείκτη στο I και ρυθμίζει τη θερμοκρασία στους 37°C.

12γ	Προετοιμασία οργάνων γ. Άνοιγμα φυγοκεντρική	Αναλυτής/-ρια	Ενεργοποιεί τον φυγοκεντρική πατώντας το κουμπί ON, που βρίσκεται στο πλάι δεξιά. Ρυθμίζει το πρόγραμμα φυγοκέντρωσης στα 5 min, 10.000 rpm και 18°C.
13	Φυγοκέντρωση δειγμάτων	Αναλυτής/-ρια	Τοποθετεί τα δείγματα μέσα στην κεφαλή του φυγοκεντρική σε αντιδιαμετρικές θέσεις και κλείνει καλά το καπάκι της κεφαλής και του φυγοκεντρική. Πατάει Start για να ξεκινήσει η φυγοκέντρωση. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης βγάζει και επανατοποθετεί τα δείγματα σε στατώ προσεκτικά, ώστε να προστατευθεί το υπερκείμενο αιμόλυμα από πιθανή ανατάραξη του ιζήματος.
14	Προετοιμασία φιαλιδίων erpendorf για την ανάλυση	Αναλυτής/-ρια	Ετοιμάζει και αριθμεί τόσα φιαλίδια erpendorf όσα και τα δείγματα αίματος συν ένα για το τυφλό.
15	Τοποθέτηση διαλύματος εργασίας	Αναλυτής/-ρια	Σε κάθε φιαλίδιο τοποθετεί 725 μL διαλύματος εργασίας.
16	Προσθήκη αιμόλυματος ή διαλύματος HClO <sub>4</sub>	Αναλυτής/-ρια	Σε κάθε φιαλίδιο που αντιστοιχεί σε δείγμα αίματος προσθέτει 25 μL του αντίστοιχου αιμόλυματος με ξεχωριστό ρύγχος. Στο φιαλίδιο για το τυφλό προσθέτει 25 μL 0,3 mol/L HClO <sub>4</sub> . Κλείνει και ανακινεί όλα τα φιαλίδια στον κυκλομείκτη.
17	Επώαση	Αναλυτής/-ρια	Τοποθετεί όσα φιαλίδια περιέχουν δείγματα ηρεμίας στον κλίβανο για 15 min, ενώ όσα φιαλίδια περιέχουν δείγματα άσκησης για 30 min. (Το φιαλίδιο για το τυφλό δεν χρειάζεται επώαση.)
18α	Μέτρηση α. Ρύθμιση φασματοφωτόμετρου	Αναλυτής/-ρια	Στο φασματοφωτόμετρο επιλέγει 1 (Basic mode) και enter, στη συνέχεια set λ 340 nm και enter και, τέλος, factor 53,05 και enter.
18β	Μέτρηση β. Τοποθέτηση δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο και ανάγνωση συγκέντρωσης	Αναλυτής/-ρια	Με τη χρήση πιπέτας 100-1000 μL, μεταφέρει το τυφλό σε γυάλινη κυψελίδα semi-micro, την οποία και τοποθετεί στη θέση αναφοράς. Στη συνέχεια μεταφέρει ομοίως τα δείγματα σε γυάλινες κυψελίδες semi-micro, τις οποίες τοποθετεί κατά σειρά στο καρουζέλ. Κλείνει καλά το καπάκι του διαμερίσματος δειγμάτων, πατά τον αριθμό θέσης κάθε δείγματος στο καρουζέλ (π.χ. 1) και πατά enter. Καταγράφει τη συγκέντρωση που δείχνει το όργανο στην οθόνη του.
19	Συμμάζεμα	Αναλυτής/-ρια	Μετά το τέλος της μέτρησης όλων των δειγμάτων, απορρίπτει όσα υλικά δεν χρειάζονται ή ήταν μιας χρήσης, πλένει τα σκεύη που χρησιμοποίησε και αποθηκεύει δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο και στον καταψύκτη. Τέλος, τακτοποιεί στη θέση του ό,τι μεταχειρίστηκε.

### ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

A/α	Πρόβλημα	Αντιμετώπιση
1	Απροσδόκητα υψηλές τιμές	Ελέγχουμε αν είναι καθαρή εξωτερικά η κυψελίδα. Αν δεν είναι, τη σκουπίζουμε προσεκτικά με χαρτομάντηλο και ξαναμετράμε. Αν η υπερβολικά υψηλή τιμή επιμένει, είναι πιθανό να έχουμε πάρει ίζημα μαζί με το υπερκείμενο αιμόλυμα, οπότε επαναλαμβάνουμε την ανάλυση.
2	Απροσδόκητα χαμηλές τιμές	Είναι πιθανό να μην έχουμε πάρει επαρκή ποσότητα αιμόλυματος, οπότε επαναλαμβάνουμε την ανάλυση.

Δημιουργήθηκε από	Θανάση Καμπασακάλη, Στέφανο Νικολαΐδη, Κωνσταντίνο Παπαδημητρίου
Ελέγχθηκε από	Βασίλη Μούγιο, Ανατολή Πετρίδου
Ημερομηνία	5 Ιουνίου 2018